

ハブ咬症治療における特殊抗毒素の基礎的実験

－酵素標識抗マングース IgG マウス抗体の作製－

櫻井 秀樹

キーワード：マングース血清，ハブ毒，酵素免疫測定法，アフィニティークロマトグラフィー

序文

ハブ毒はタンパク性の毒素であり、その主要毒性は出血毒である。この出血毒素はタンパク分子量の大きさ等により、大きく2つの毒性因子として出血因子1 (HR-1) と出血因子2 (HR-2) に分けることができる。野崎らは、マングース血清が現在、ハブ咬症患者に使用されている抗毒素と同じ程度にHR-1を中和するが、HR-2の中和作用を持たないことを報告している^{1)~3)}。

著者は、以前、マングースに15週間のハブ毒免疫を行い、抗HR-2抗体価を上昇させて、HR-1、HR-2をバランスよく中和するようになるかどうかを調べた。免疫期間中の6、10、15週目に採血した血液をELISA (酵素免疫測定法) で抗HR-2価の測定を行った結果、最も力価の高かった個体で抗HR-2価が100 u/ml程度まで上昇したが、これは現在使用されている抗毒素の3分の1ほどであった⁴⁾。

抗体価測定方法であるELISAは、生体中に含まれる微量抗原または抗体の免疫学的特性を利用し、感度が高く、測定が容易な酵素に置き換えて定量する方法であり、微量で多数の検体を感度よく測定するのに適している。

ハブ毒を免疫したマングース血清の抗体価測定は、標準抗毒素 (ウマ血清) とマングース血清の両方に同じように反応させる必要があるため、毒素 (HR-1 または HR-2) を酵素 (peroxidase) でラベルした酵素標識抗原を使用したが、毒素は種類ごとに酵素との結合部位が異なり、安定した標識抗原が得られにくいため、酵素との結合部位が明らかにされている抗体を酵素でラベルし、使用するのが一般的である。

ハブ毒においても分子量が大きいHR-1を酵素と結合させたHR-1と酵素のコンジュケートは保存中に劣化することが多い。

そこで、本研究は、ハブ毒免疫したマングース血中抗体価を感度よく測定するために、マングースの免疫グロブリン (IgG) でマウスを免疫し、産生された抗体に酵素を結合させ、ELISA用酵素標識抗体の作製を試みた。

材料と方法

1. マングース IgG の分離と精製

1・1. マングース血清

沖縄県の玉泉洞文化村より譲渡されたマングース (*Herpestes sp.*) 10匹をクロロホルムで

深麻酔した後、腹大動脈から採血し、約 150ml の血液を得た。血液は 3 時間静置した後、3000rpm、15min. で遠心分離し、上澄みの血清約 70ml を分取した。

1・2. マングース IgG の分離精製

免疫抗原として使用するマングース IgG は、MABTrap G II キット（ファルマシア バイオテック）を使用したアフィニティークロマトグラフィーで、免疫していないマングース血清から分離精製した。

1・3. マングース IgG の純度

マングース IgG の純度の確認のために、セルロースアセテート膜を用いて電気泳動を行った。セルロースアセテート膜 1 枚あたり 120V、3mA を目安に 40min 通電し、ポンソー 3R で染色した。

2. 免疫と採血

体重 25 ± 2 g の ICR 系マウス 6 匹をマングース IgG で免疫した。基礎免疫はマングース IgG 溶液とフロイントアジュバント・コンプリートを等量ずつ混合し、ホモジナイザーで攪拌して乳化させた後、マウス腹腔内に注射した。追加免疫はマングース IgG 溶液のみを 1 週間おきに計 5 回、腹腔内注射で行った。免疫のスケジュール及び注射量を図 1 に示す。

採血はマウスをエーテル麻酔した後、開胸して心臓から全採血した。6 匹分のマウス血液を 1 つの試験管にまとめ、室温環境で 3 時間静置した後、3000rpm、15min. で遠心分離を行い血清約 2ml を得た。

血清中の抗体を peroxidase 標識抗マウス β 、 γ グロブリン山羊血清（コスモバイオ）を使用し、ELISA で測定し、抗体価の上昇を確認した。

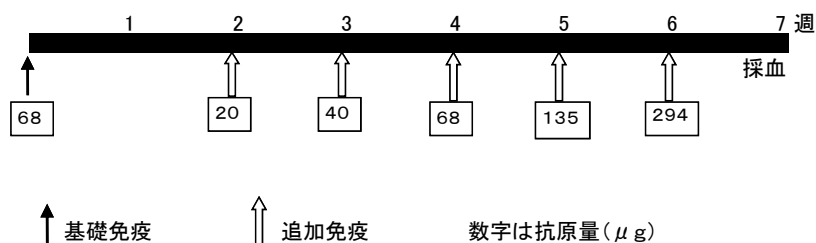


図 1. マウスのマングースIgG抗原免疫スケジュール

3. マングース血清の精製

Protein pak G-DEAE (8.2×75cm: Waters) で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行い、マングース γ -グロブリンを採取した。

4. アフィニティークロマトグラフィーによるマウス血清の精製

マングース γ -グロブリンをカップリングさせたホルミルセルロフアイン（生化学工業）を用いて、マウス血清からマングース γ -グロブリンに反応する抗体成分を分離し、マウス血清の精製を行った。

5. ELISA による抗体価測定

15 週間のハブ毒免疫をしたマングース血清を、HR-1、HR-2 でコーティングした EIA プレートを用いて、サンドイッチ法により以下の手順で行った。

HR-1 または HR-2 をコーティングした EIA フラットプレート（三光純薬）の各ウェルに検体 $100\mu\text{l}$ を分注し、 37°C 、30min シェーカーインキュベーターで攪拌した後、Auto mini wasyer で 5 回洗浄を行った。洗浄液は 0.15M 食塩加 0.01M リン酸緩衝液（pH7.4）に Tween20 を加えたものを使用した。

次に各ウェルに、今回作製した酵素標識マングース IgG 免疫マウス血清（酵素標識抗体）を適当な濃度に希釈し、これを $100\mu\text{l}$ 加え、前回と同様に 37°C 、30min シェーカーインキュベーターで攪拌した後、Auto mini wasyer で 5 回洗浄を行った。酵素標識抗体の希釈には、1% 牛血清アルブミンと、0.05% Tween20 を加えた 0.15M 食塩加 0.01 M リン酸緩衝液（pH7.4）を使用した。最後に、各ウェルに基質液 $100\mu\text{l}$ を加えて約 10 分間遮光条件で反応させた後、1 N 硫酸 $100\mu\text{l}$ を加えて反応を停止させた。基質液は o - フェニレンジアミン塩酸塩 35mg と 30% 過酸化水素水 30ml を加え、それを 0.1M クエン酸 - 0.2M リン酸水素 2 ナトリウム緩衝液（pH4.8）100ml に溶解したものを使用した。吸光度は Microplate reader MPT-32（Corona）で 492nm の波長を測定した。血清中のタンパク量測定は分光光度計（日立 U-4000）で 280nm の吸光度を測定し、血清 $\text{mg/ml} = 1.250D_{280}$ として計算した。

6. タンパク量の測定

分光光度計（日立 U-4000）で 280nm の吸光度を測定し、血清蛋白 $\text{mg/ml} = 1.250D_{280}$ として蛋白量を算出した。

結果と考察

1. マングース IgG の分離精製（図 2）

MAbTrap G II キットを使用したアフィニティークロマトグラフィーで、マングース血清から IgG を分離した。MAbTrap G II キットには HiTrap Protein G 1ml カラムと、結合、溶出、中和用の濃縮バッファー、5ml シリンジがセットになっている。これらを使用した操作方法を以下に示す。

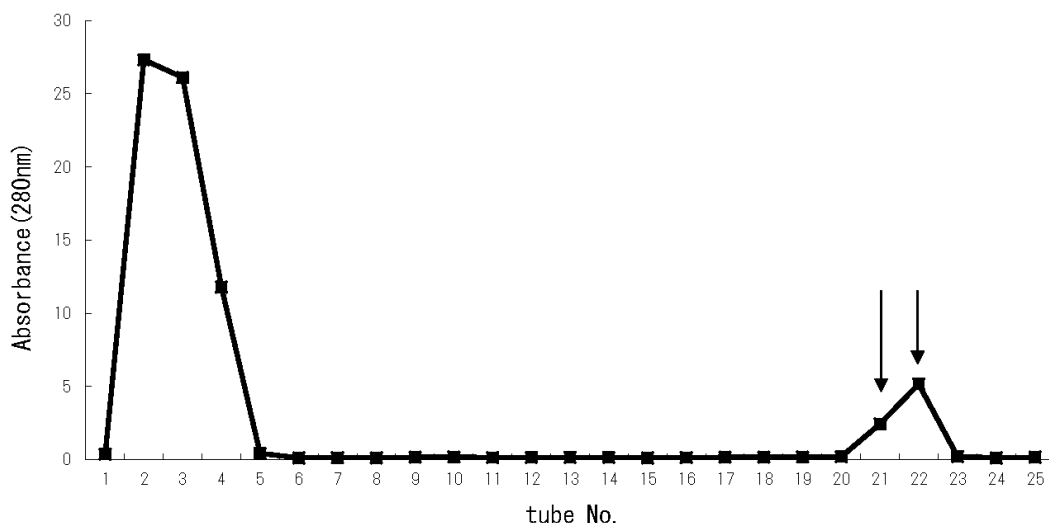


図2. HiTrap Protein Gカラムを用いたマングース血清のIgG分離

1・1. 結合バッファーと溶出バッファーの準備

セットになっている結合バッファーと溶出バッファーを指定濃度に希釈する。

1・2. HiTrap Protein G 1ml カラムの洗浄

カラムには防腐のため 20%エタノールが入っているので、まず、蒸留水 10ml、続いて結合バッファー 5 ml で洗浄する。

1・3. サンプル（マングース血清）の添加

マングース血清 1 ml と結合バッファー 1 ml を混和し、シリンジを用いて緩やかに添加する。添加速度はカラムから滴下するバッファー液が、1 秒間に 1 滴滴下するように調節する。

1・4. 結合バッファーの送液

結合バッファーを送液し、小試験管に 1 ml ずつ集める。カラムから滴下するバッファーが、1 秒間に 1 滴になるようにシリンジに加える圧を調節する。試験管に溶出した結合バッファーには Protein G に結合しない IgG 以外の血清蛋白が含まれているので、これらは波長 280nm の吸光度測定をして、吸光度が充分下がったところで結合バッファーの送液をやめる。

図2の矢印で示した tube No. 21、22 を採取して、0.45 μ m Filter Unit（マイレックス HA：ミリポア）で除菌し、免疫用抗原とした。

1・5. 溶出バッファーの送液

溶出バッファーを 1・4 と同様に送液する。溶出バッファーの送液によってカラム内の pH が大きく変化し、吸着された IgG が解離溶出する。1・4 と同様に吸光度を測定し、吸光度が高い部分の溶出液を採取する。

1・6. 溶出液の中和

溶出バッファーは強酸性で、長期間放置すると IgG が変性するので、1 ml あたり 0.75 μ l の割合で中和バッファーを加え、速やかに中性に戻す。

1・7. カラムの洗浄・保存

カラムに蒸留水 10ml を流した後、続けてサンプルを添加する場合は、結合バッファーを 5 ml 流す。終了し、カラムを保存する場合はカラム内を 20%エタノールで置換する。

アフィニティークロマトグラフィーは吸着クロマトグラフィーの一種で、不溶性のマトリクスに結合した特異的な親和性を持つ物質（リガンド）を使って目的成分を吸着させ回収する方法である⁵⁾。その原理はまず、リガンドとの特異的結合を促進する条件でサンプルのマングース血清を添加して、目的成分であるマングース IgG をアフィニティゲルに吸着させ、吸着しない IgG 以外の血清蛋白成分を結合バッファーで洗浄除去する。次に吸着を解除する溶出条件に変更して、目的成分を解離溶出する。この方法では、一度の操作で組織液のようにいろいろな成分が混在する中で、目的とする物質だけを高い精度で効率よく分離することができる。

2. 電気泳動による IgG の純度チェック（図 3）

アフィニティークロマトグラフィーで分離したマングース IgG の純度をチェックするため、セルロースアセテート膜を用いて電気泳動を行った。結果と泳動条件を図 3 に示す。 Protein G カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで、純度の高いマングース IgG が分離できたことを確認した。

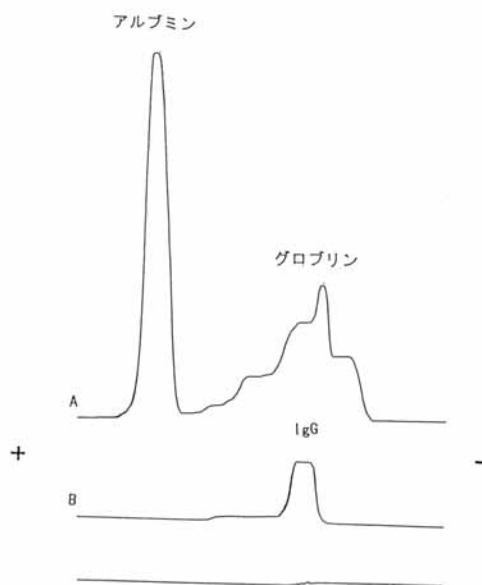


図3. マングース血清のセルロースアセテート膜電気泳動

緩衝液：ペロナル緩衝液 pH=8.6 I=0.06
試料：A マングース血清 B:Protein G精製マングースIgG
通電：120V 3mA 40min.
染色：0.4%ボンソー3R（5%トリクロール酢酸溶液）
脱色：5%酢酸溶液
デンストメトリー：デカヒドロナフタリンで膜を透明化した後、デンストメーターで波長500nmの吸光度を測定

3. HPLCによるマングース血清の精製 (図4)

アフィニティークロマトグラフィーでマウス血清を精製するため、まず、Protein pak G-DEAE (8.2×75mm) による HPLC でマングース血清の精製を行った。結果と溶出条件を図4に示す。5つの fraction が得られ、この中でγグロブリンに相当すると考えられる fraction1、fraction2を採取し、メンブランフィルター (CX-10 immersible: ミリポア) 分子量 10000 で濃縮後、アフィニティーゲル作製に供した。

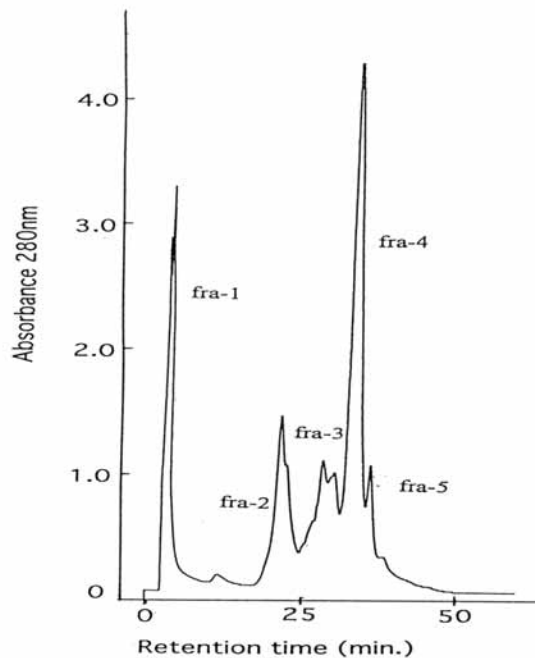


図4. 高速液体クロマトグラフィーによるマングース血清の精製

カラム : Protein pak G-DEAE (8.2×75mm)
試料 : マングース血清
BufferA : pH=7.0 0.01M PBS
BufferB : pH=7.0 0.01M PBS (0.5M NaCl)
Flow : 0~05min. A 100%, 05~30min. B 80% 1.0ml/min.

4. アフィニティークロマトグラフィーによるマウス血清の精製

HPLC で分離採取した、マングース血清の fraction1、fraction2 をカップリングさせたアフィニティーゲルを用いて、マングース IgG 免疫マウス血清を精製した。アフィニティーゲルの調整と血清の精製法を以下に示す。

4・1. アフィニティーゲル作成

4・1・1. ゲルの洗浄

必要量のホルミルセルロファインを、純水で酢酸臭がなくなるまで十分に洗浄する。

4・1・2. リガンドのカップリング

ゲルに HPLC で分離採取したマングース血清の fraction1、fraction2 を結合させる。カッ

プリングバッファー（0.2M, pH=7.0, PBS-0.1N NaCl）に溶解されたゲルに同じバッファーに溶解されたマングースγグロブリンを加え、穏やかに攪拌しながら室温で5～6時間反応させた。続いてゲルとリガンドの結合を安定させるため、還元剤（水素化シアノホウ素ナトリウム： NaCNBH_3 ）を7mg/g wet gelの割合で加え、さらに2～3時間室温で穏やかに攪拌した。

4・1・3. ゲルの洗浄

抗原と結合したゲルをカップリングバッファーで洗浄し、過剰量のマングース血清 fraction 1、fraction 2を除去した。

4・1・4. 活性残基のブロッキング

リガンドが結合しなかったゲルの中の活性基を、一級アミノ基を持った試薬でブロックする。リガンドカップリングゲルをブロッキングバッファー（0.2M, pH=7.0 トリスバッファー）に溶解した後、水素化シアノホウ素ナトリウムを7mg/g wet gelの割合で加え、室温で5～6時間穏やかに攪拌した。

4・1・5. ゲルの緩衝化

約20倍量のスターティングバッファー（0.01M, pH=7.4, PBS-0.15N NaCl）で洗浄して十分に緩衝化してからカラムに充填した。

4・2. 抗体の精製

4・2・1. ゲルの緩衝化

調整した抗原結合ゲルをカラムに充填した後、さらにスターティングバッファーを流して十分に緩衝化した。

4・2・2. 抗体の吸着

十分に緩衝化されたカラムに、同じバッファーで緩衝化されたマングース IgG 免疫マウス血清を緩やかな速度で加え、含まれている抗体アフィニティーゲルに結合させた。過剰量の抗体と、結合しなかった抗体以外の血清成分は緩衝液で充分洗い流した。

4・2・3. 抗体の溶出（図5）

免疫抗体の解離溶出は、0.1M, pH=2.3 グリシン塩酸緩衝液で行った。溶出液は1.0M, NaClで速やかに中和した。

結果と溶出条件を図5に示す。アフィニティーゲルに結合した後、解離溶出された fraction 2を採取し、メンブランフィルターで濃縮後、ELISA 用の酵素標識抗マングース IgG マウス抗体の作製に供した。

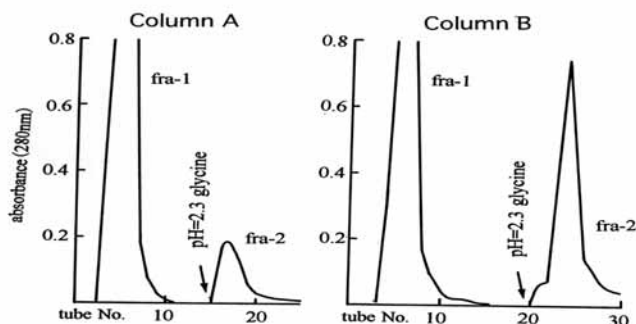


図5. アフィニティークロマトグラフィーによるマングースIgG免疫マウス血清の精製

試料：マングースIgG免疫マウス血清
カラムA：fra-1カップリングホルミルセルロフィン（1.5×2cm）
カラムB：fra-2カップリングホルミルセルロフィン（1.5×2cm）
Flow：20ml/hour 3ml/tube

5. 酵素標識抗マングース IgG マウス抗体の作製

酵素と抗マングース IgG マウス抗体との結合は、過ヨウ素酸法⁶⁾で行った。操作の方法を以下に示す。

5・1. peroxidase のアルデヒド化

5・1・1. Horseradish peroxidase (Sigma, Type VI) 5mg を 0.3M 重炭酸ナトリウム溶液 1ml に溶解させた後、0.32% p - ホルムアルデヒド 25 μ l を加え、室温で 30 分間攪拌する。

5・1・2. 無水アルコールで、0.1%フルオロジニトロベンゼン (FDNB) (Merch) 溶液を作り、その 0.1ml を 5・1・1 の酵素液に加える。

5・1・3. さらに 0.04M メタ過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) 水溶液を 1 ml 加えて 30 分間、室温でゆっくり攪拌し、酵素をアルデヒド化する。

5・1・4. 1.6M グリセリン溶液 0.1ml を加え、室温で 1 時間攪拌し、酸化を終わらせる。

5・1・5. 1 ℓ の 0.01M 炭酸ナトリウム緩衝液 pH=9.5 に一晚透析して、FDNB を除去する。

5・2. 酵素と抗体の結合と酵素標識抗体の作製 (図 6)

5 mg 相当量のマングース IgG 免疫マウス血清を、5・1 でアルデヒド化した酵素液に加え、室温で 3 時間攪拌する。この酵素抗体反応液を、Sephadex G-100 (2.5 \times 90cm: ファルマシア) にかけて、結合及び非結合酵素を分離精製する。

結果を図 6 に示す。抗体と結合した酵素は分子量が大きくなり、早い時間に溶出するようになるので、先に溶出する fraction1 (tube No. 33~37) を ELISA 用の酵素標識抗体液とした。

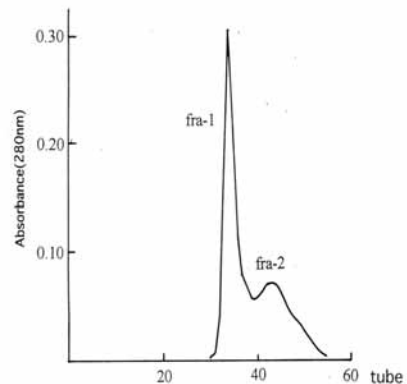


図 6. 酵素標識抗体の精製

試料：酵素標識マングースIgG免疫マウス血清
カラム：Sephadex G 100 (2.5 \times 90 cm)
Flow: 20ml/hour 4ml/tube

6. 酵素標識抗体による抗体価測定

6・1. ハブ毒免疫したマングースからの採血 (図 7)

ハブ毒で免疫したマングース (n=5) から免疫期間中 1 週目の基礎免疫後、6、8、10、12、15 週目の追加免疫の前に 1~3 ml 採血した。今回はそのうち 6 週目、10 週目、15 週目に採血した血液から血清を分離しそれぞれ、serum 6、serum10、serum15 として抗体価測定に用いた。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	週
0.2	0.2				0.03	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.2	1.8		1.8		
↑					↑		↑		↑		↑			↑	↑	
採血					採血		採血		採血		採血			採血	全採血	
					serum6				serumu10					serumu15		

図7. マングースの免疫、採血のスケジュール

※ 内の数字はトキシイド溶液及び1%ハブ粗毒溶液中に含まれるハブ毒量(タンパク質量mg換算)

6・2．酵素標識抗マングース IgG マウス血清による抗体価測定（表1）

作製した酵素標識抗マングース IgG マウス血清で serum 6、serumu10、serumu15 の抗体価を測定した。結果を表1に示す。

作製した酵素標識抗マングース IgG マウス血清は、マングース IgG だけに特異的結合するもので、標準抗毒素の抗はぶウマ抗毒素（ウマの IgG）に反応しない。そのため、毒素 HR-1、HR-2 に酵素をラベルしたときのように抗体価を単位で表すことはできないが、毒素を酵素でラベルした酵素標識抗原を使用したときの 100 分の 1 レベルまで低い抗体の検出が可能となった。

また、抗原に酵素をラベルする場合、抗 HR-1 価と抗 HR-2 価の測定用にそれぞれ別に作製する必要があるが、抗体にラベルしたコンジュケートを使用すれば、プレートを別々にするだけで抗 HR-1 価と抗 HR-2 価両方の測定が可能である。

表1. 酵素標識抗マングースIgGマウス血清を使用したELISAによる抗体の測定(OD492、吸光度)

血清		希釈倍数					
		× 800	× 1600	× 3200	× 6400	× 12800	× 25600
抗HR-1抗体	serumu 6	1.622	1.894	0.773	0.400	0.378	0.252
	serumu10	2.535	2.648	2.156	1.596	1.435	0.896
	serumu15	2.732	2.867	2.340	1.710	1.485	1.044
抗HR-2抗体	serumu 6	1.243	1.045	0.860	0.564	0.197	
	serumu10	1.647	1.439	1.269	0.963	0.590	
	serumu15	1.645	1.471	1.288	1.057	0.571	

まとめ

1. MAbTrap G II キットを使用したアフィニティークロマトグラフィーでマングース血清から効率よく IgG を分離できた。
2. マウスをマングース IgG で免疫することにより、マウスは良好に抗マングース IgG 抗体を産生した。
3. 作製した酵素標識抗マングース IgG マウス血清を用いて ELISA を行うことで、毒素を酵素でラベルした従来の測定法よりも、抗 HR-1 価と抗 HR-2 価の検出において、100 倍程度感度を高めることができた。

引用文献

- 1) 沖縄県衛生環境研究所 (1987) 『昭和 62 年度抗毒素研究報告書』, 53 - 61.
- 2) 沖縄県衛生環境研究所 (1989) 『平成元年度抗毒素研究報告書』, 15 - 23.
- 3) K. Yonaha, M. Nozaki, Y. Kawamura, M. Yamakawa, T. Kamura, S. Toyama (1987) Antihemorrhagic activity in the sera of *DINODON SEMICARINATUM* and *HERPESTES EDWARDSII*, THE SNAKE, 19, 19 - 25.
- 4) 櫻井秀樹他 (2006) ハブ毒免疫したマングースの血中抗体価に関する実験, 『琉球大学農学部学術報告』, 53, 1-5.
- 5) ファルマシア バイオテック株式会社編 (1994) Monoclonal Antibody Purification Handbook, 21 - 23.
- 6) NAKANE, P. K. and KAWAOI, A. (1974) Peroxidase-labelled Antibody. A new method of conjugation, J. Histochem, 22, 1084.

Experimental Study on a Unique Anti Venom for the Treatment of Habu Bites

— Preparation of Enzyme-Labeled Anti-Mongoose IgG Mouse Antibodies —

Hideki SAKURAI

We were able to separate the IgG from the mongoose serum efficiently by affinity chromatography using a MAbTrap G II kit. Further, by immunizing the mice with mongoose IgG, the mice satisfactorily produced anti-mongoose IgG antibodies. By performing the ELISA using the prepared enzyme-labeled anti-mongoose IgG mouse serum, we were able to increase the sensitivity of the detection of anti-HR-1 and anti-HR-2 titers by approximately 100 times compared with the conventional measurement method.

Key Words : mongoose serum, Habu venom, ELISA, affinity chromatography